黑曲霉固态发酵改善茶渣营养价值的研究

朱　飞[1]　苏　娣[1]　冉　雷[1]　范彩云[1]　张子军[1]　刘政权[2]　宛晓春[2*]　程建波[1*]

（1.安徽农业大学动物科技学院，合肥 230036；2.安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室，合肥 230036）

摘　要：本试验旨在利用黑曲霉（*Aspergillus niger*,AN）固态发酵茶渣，提高其营养价值，并筛选出最佳的茶渣发酵工艺参数。以茶单宁（TTN）和粗蛋白质（CP）含量为指标，采用单因素试验和 $L_9(3^4)$ 正交设计优化玉米粉含量、料水比、接种量、发酵温度和发酵时间。结果表明：1）在茶渣中添加 5%玉米粉，AN 孢子接种量 1.00×10^6 个/g，料水比 1.0∶1.4，37 ℃下发酵 8 d 时效果最好；2）在最佳发酵工艺条件下，以干物质（DM）为基础，经 AN 发酵后茶渣 CP 含量由 31.22%提高到 44.56%（P<0.05），真蛋白质（TP）含量由 23.64%提高到 36.99%（P<0.05），粗脂肪（EE）含量由 4.06%提高到 5.13%（P<0.05），粗灰分（Ash）含量由 4.09%提高到 6.09%（P<0.05），钙（Ca）含量由 0.75%提高到 1.10%（P<0.05），磷（P）含量由 0.32%提高到 0.47%（P<0.05），提高率分别为 42.73%、56.47%、26.35%、48.90%、46.67%和 46.88%；TTN 含量由 11.63%降低到 2.42%（P<0.05），中性洗涤纤维（NDF）含量由 39.85%降低到 32.96%（P<0.05），酸性洗涤纤维（ADF）含量由 15.70%降低到 12.28%（P<0.05），降解率分别为 79.19%、17.29%和 21.78%；17 种氨基酸（AA）含量均显著提高（P<0.05）且总 AA 含量提高了 26.72%。由此可见，利用 AN 固态发酵可以显著提高茶渣的营养价值。

关键词：黑曲霉；茶渣；茶单宁；固态发酵；营养价值

收稿日期：2018-03-22
基金项目：安徽农业大学茶树生物学与资源利用国家重点实验室开放基金资助项目（SKLTOF20160203）；安徽省牛羊产业技术体系资金（AHCYJSTX-07）
作者简介：朱　飞（1990-），男，湖北随州人，硕士研究生，研究方向为动物营养与饲料科学。E-mail: 1455089928@qq.com
*通信作者：宛晓春，教授，博士生导师，E-mail: xcwan@ahau.edu.en；程建波，教授，硕士生导师，E-mail: chengjianboahau@163.com

中图分类号：S816.6　　　　　　文献标识码：A　　　　　　文章编号：

茶渣是茶饮料、速溶茶和茶单宁（TTN）产业等加工茶叶后产生的残渣，据统计，仅茶饮料和速溶茶公司每年产生的茶渣就高达 16 万 t。研究报道，茶渣的粗蛋白质（CP）含量为 26%～35%，是一种良好的蛋白质饲料资源[1]，但茶渣中的 TTN 是一种具有涩味的抗营养因子，会抑制动物对饲料的摄入[2]，其含有的酚羟基能螯合饲料中的铁、铜和锌等金属元素以及蛋白质，形成大分子金属-单宁和蛋白质-单宁螯合物，降低肠道对金属元素和氮的吸收利用率[3-4]，TTN 还能以非竞争性方式抑制胰α-淀粉酶的活性，从而影响动物对淀粉的消化吸收[5]。除此之外，机体吸收单宁后还会引起肝毒性和肾毒性，对于反刍动物而言，TTN 不仅可以与瘤胃微生物细胞外酶反应，还能与微生物细胞壁结合，使微生物失去生长所需的底物，并抑制氧化磷酸化和电子传递，从而破坏瘤胃微生物区系稳态[4]。这些因素均限制了茶渣在动物饲料中的广泛应用，通常被当作工业废料丢弃，造成资源的巨大浪费。预计到 2020 年，我国蛋白质饲料资源缺口将达到 4 800 万 t，在此窘境下，科学工作者开始关注糟渣类饲料资源的开发与利用，并获得了较高质量的生物饲料资源[6]。目前，我国对茶渣的利用主要集中在功能性成分提取[7]、栽培食用菌[8]和制备有机肥[9]等方面，国外则注重在环境治理中的应用，例如使用茶渣去除废水中重金属离子[10]和有机污染物[11]以及吸附有害气体[12]等，但将茶渣饲料化的研究并不多见。

黑曲霉（*Aspergillus niger*,AN）作为一种大型真菌，具有生长旺盛、发酵周期短且不产生毒素等特点，是美国食品药品监督管理局（FDA）认证的安全菌种之一，可分泌淀粉酶、纤维素酶、植酸酶等酶类[13]，部分 AN 还可分泌单宁酶[14-15]。本试验以 AN 为发酵菌种，期望利用 AN 产生的单宁酶和纤维素酶降解 TTN 和纤维素，在降低茶渣中 TTN 含量的同时有效提高 CP 含量，缓解茶渣的饲喂限制因素，开发出一种优质蛋白质饲料资源，这将为开发利用茶渣饲料资源探索出一条新途径，有效解决废弃茶渣对环境造成的巨大压力和缓解人畜争粮的尖锐矛盾，具有重要的研究价值和良好的应用前景。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　试验原料

茶渣：由浙江铭皇生物科技有限公司提供，TTN 含量为 13.30%，CP 含量为 32.30%。玉米粉：市场购买，CP 含量为 6.65%。

1.1.2　发酵菌种及培养基

AN 由中国工业微生物菌种保藏管理中心（CICC）保藏，编号为 41125。AN 所用培养基为察氏培养基。

1.2　方法

1.2.1　AN 的活化及孢子液的制备

将 AN 冻干粉溶于液体培养基，再涂布到固体培养基上，于 33 ℃恒温培养箱中培养至培养基表面铺满孢子，用液体培养基冲洗孢子获得 AN 孢子悬液，用灭菌擦镜纸过滤后于 4 ℃保存备用。

1.2.2　接种量的计算

在将 AN 孢子悬液接入茶渣发酵培养基进行发酵之前，用血球计数板法调节 AN 孢子悬液浓度为 1.25×10^7 个/mL，接种量以每克发酵底物干重所接种的孢子量表示，茶渣发酵培养基的含水量包含接入的菌液。

1.2.3　茶渣发酵培养基的制备

按比例将茶渣和玉米粉（共 50 g）在 500 mL 锥形瓶中混匀，然后倒入含有一定体积孢子悬液的纯水，用玻璃棒搅拌均匀后以 8 层无菌纱布封口。

1.3　单因素优化发酵条件试验

在自然 pH 的条件下，考察玉米粉含量、料水比（*m*/*V*）、接种量、发酵温度和发酵时间对发酵效果的影响。以 TTN 和 CP 含量为测定指标，筛选出发酵效果较好的单因素水平，

以此进行后一个单因素试验研究，每个水平 3 个重复。

1.3.1　玉米粉含量对发酵效果的影响

设置玉米粉含量分别为 0、5%、10%、15%和 20%，料水比为 1∶1.0、接种量为 1.50×10^6 个/g、发酵温度为 30 ℃、发酵时间为 4 d。

1.3.2　料水比对发酵效果的影响

在 1.3.1 确定的玉米粉含量下，设置料水比分别为 1.0∶0.8、1.0∶1.0、1.0∶1.2、1.0∶1.4 和 1.0∶1.6，其他条件同 1.3.1。

1.3.3　接种量对发酵效果的影响

在 1.3.2 确定的料水比下，设置接种量分别为 1.25×10^5、2.50×10^5、5.00×10^5、1.00×10^6 和 1.50×10^6 个/g，其他条件同 1.3.2。

1.3.4　发酵温度对发酵效果的影响

在 1.3.3 确定的接种量下，设置恒温培养箱的温度分别为 21、24、27、30、33、36 和 39 ℃，其他条件同 1.3.3。

1.3.5　发酵时间对发酵效果的影响

在 1.3.4 确定的发酵温度下，设置发酵时间分别为 2、3、4、5、6、7、8 和 9 d，其他条件同 1.3.4。

1.4　正交优化发酵条件试验

以 TTN 和 CP 含量为测定指标，在单因素试验的基础上，选择料水比、接种量、发酵温度和发酵时间 4 个因素进行 L_9（3^4）正交试验（表 1），以优化发酵条件。

表 1　L_9（3^4）正交试验设计

Table 1　Orthogonal experiment design for L_9（3^4）

水平	因素 Factors			
Levels	料水比	接种量	发酵温度	发酵时间 (D)

	Substrate/moisture (A)	Inoculation (B)/(个/g)	Fermentation temperature (C)/℃	Fermentation time/d
1	1.0∶1.3	7.50×10^{5}	35	7
2	1.0∶1.4	1.00×10^{6}	36	8
3	1.0∶1.5	1.25×10^{6}	37	9

1.5 指标测定

发酵产物 105 ℃烘干，粉碎后过 40 目筛。

CP、粗脂肪（EE）、粗灰分（Ash）、钙（Ca）和磷（P）含量的测定参照张丽英[16]的方法；中性洗涤纤维（NDF）和酸性洗涤纤维（ADF）含量的测定参照 Van Soest 等[17]的方法；TTN 含量的测定参照 GB/T 8313-2002[18]的方法，真蛋白质（TP）含量的测定参照胡艳丽等[19]的方法，氨基酸（AA）含量采用氨基酸自动分析仪（日立 L-8900）测定。

1.6 数据统计与分析

试验数据用 Excel 2007 进行预处理，然后采用 SAS 9.2 进行统计分析。单因素试验数据进行单因素方差分析，再结合 Duncan 氏法进行多重比较；正交试验数据进行极差分析。$P<0.05$ 表示差异显著，结果以平均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 单因素优化发酵条件试验结果

2.1.1 玉米粉含量对发酵效果的影响

由表 2 可知，当玉米粉含量为 5%时，TTN 含量降至最低，为 2.17%，显著低于其他玉米含量组（$P<0.05$），同时 TTN 降解率最高，为 81.34%，之后 TTN 降解率随着玉米粉含量的增多而逐渐降低；CP 含量随着玉米粉含量的增多而逐渐降低，但 CP 增长率逐渐升高，说明玉米粉过量添加有利于 CP 含量的提高，但是不利于 AN 对 TTN 的降解。综合考虑，选择在茶渣中添加 5%的玉米粉作为最适发酵培养基组成。

表 2　玉米粉含量对茶渣营养价值的影响（干物质基础）

Table 2　Effects of corn flour content on nutritional value of tea residue (DM basis)　　%

玉米粉含量 Corn flour Content/%	茶单宁 TTN			粗蛋白质 CP		
	对照组 Control group	发酵组 Fermentation group	降解率 Degradation rate	对照组 Control group	发酵组 Fermentation group	增长率 Increase rate
0	12.23±0.14^{a}	2.34±0.06^{b}	80.87	33.63±0.20^{a}	38.94±0.19^{a}	15.79
5	11.63±0.21^{b}	2.17±0.05^{c}	81.34	31.22±0.19^{b}	37.01±0.13^{b}	18.55
10	11.06±0.07^{c}	2.34±0.08^{b}	78.84	30.03±0.17^{c}	36.30±0.09^{c}	20.88
15	9.94±0.25^{d}	2.42±0.12^{b}	75.65	29.20±0.10^{d}	36.11±0.10^{c}	23.66
20	9.30±0.18^{e}	2.69±0.00^{a}	71.08	27.91±0.01^{e}	35.50±0.06^{d}	27.19

降解率（%）=100×（对照组-发酵组）/对照组；增长率（或提高率）（%）=100×（发酵组-对照组）/对照组。表 8 和表 9 同。

同列数据肩标不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$），相同字母表示差异不显著（$P>0.05$）。

Degradation rate (%)=100×(control group-fermentation group)/control group; increase rate (%)=100×(fermentation group-control group)/control group. The same as Table 8 and Table 9.

In the same column, values with different small letter superscripts mean significant difference ($P<0.05$), while with the same letter superscripts mean no significant difference ($P>0.05$).

2.1.2　料水比对发酵效果的影响

由表 3 可知，TTN 含量随着培养基水分含量的增多而呈现出先下降后上升的趋势，当料水比为 1.0∶1.4 时，TTN 含量降至最低，为 2.74%，显著低于其他组（$P<0.05$）；料水比在 1.0∶（1.2～1.6）时，CP 含量差异不显著($P>0.05$)，但均显著高于料水比为 1.0∶0.8 时（$P<0.05$），当料水比为 1.0∶1.4 时,CP 含量达到最高，为 37.94%。综合考虑 TTN 和 CP 含量以及发酵产物的烘干成本，选择 1.0∶1.4 为最佳料水比。

表 3　料水比对茶渣营养价值的影响（干物质基础）

Table 3　Effects of substrate/moisture on nutritional value of tea residue (DM basis)　%

项目 Items	料水比 Substrate/moisture				
	1.0∶0.8	1.0∶1.0	1.0∶1.2	1.0∶1.4	1.0∶1.6
茶单宁 TTN	3.80±0.10^{a}	3.20±0.06^{b}	3.21±0.07^{b}	2.74±0.04^{c}	3.12±0.13^{b}
粗蛋白质 CP	36.60±0.25^{c}	37.53±0.13^{b}	37.71±0.16^{ab}	37.94±0.15^{a}	37.93±0.02^{a}

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（P<0.05），相同字母表示差异不显著（P>0.05）。表 4 至表 6 同。

In the same row, values with different small letter superscripts mean significant difference (P<0.05), while with the same letter superscripts mean no significant difference (P>0.05). The same as Table 4 to Table 6.

2.1.3　接种量对发酵效果的影响

由表 4 可知，接种量为 5.00×10^{6} 和 1.00×10^{6} 个/g 时 TTN 含量相对较低，其中 5.00×10^{5} 个/g 组的 TTN 含量为 3.75%，显著低于除 1.00×10^{6} 个/g 组外的其他各组(P<0.05)；CP 含量随着接种量的增加而升高，当接种量为 1.00×10^{6} 个/g 时，CP 含量达到最高，为 37.88%。5.00×10^{5} 个/g 组和 1.00×10^{6} 个/g 组的 TTN 含量差异不显著(P>0.05)，且 1.00×10^{6} 个/g 组的 CP 含量显著高于 5.00×10^{5} 个/g 组(P<0.05)。综合考虑，选择 1.00×10^{6} 个/g 的接种量为最佳接种量。

表 4　接种量对茶渣营养价值的影响（干物质基础）

Table 4　Effects of inoculation on nutritional value of tea residue (DM basis)　%

项目 Items	接种量 Inoculation/(个/g)				
	1.25×10^{5}	2.50×10^{5}	5.00×10^{5}	1.00×10^{6}	1.50×10^{6}

茶单宁 TTN	4.21±0.20[a]	4.09±0.16[a]	3.75±0.15[b]	3.92±0.07[ab]	4.09±0.20[a]
粗蛋白质 CP	36.73±0.15[c]	37.43±0.06[b]	37.38±0.08[b]	37.88±0.10[a]	37.82±0.14[a]

2.1.4 发酵温度对发酵效果的影响

由表 5 可知，TTN 含量随着发酵温度的升高而逐渐降低，在 36 ℃时达到最佳，仅为 2.96%，显著低于其他温度组(P<0.05)；CP 含量则与发酵温度呈正相关，当发酵温度在 36～39 ℃时，CP 含量显著高于其他温度组(P<0.05)，并在 36 ℃时达到最高水平，为 38.50%。因此，选择 36 ℃为最佳发酵温度。

表 5 发酵温度对茶渣营养价值的影响（干物质基础）

Table 5 Effects of fermentation temperature on nutritional value of tea residue (DM basis) %

项目 Items	发酵温度 Fermentation temperature/℃						
	21	24	27	30	33	36	39
茶单宁 TTN	6.98±0.20[a]	5.10±0.11[b]	4.01±0.22[c]	3.85±0.21[c]	3.34±0.20[d]	2.96±0.19[e]	3.23±0.21[de]
粗蛋白质 CP	34.16±0.08[e]	35.86±0.00[d]	36.06±0.14[d]	36.31±0.06[c]	36.66±0.13[b]	38.50±0.11[a]	38.47±0.12[a]

2.1.5 发酵时间对发酵效果的影响

由表 6 可知，TTN 含量随着发酵时间的延长而逐渐降低，发酵时间为 8、9 d 时的 TTN 含量分别为 1.81%、1.84%，显著低于其他时间组(P<0.05)；CP 含量随着发酵时间的延长而逐渐升高，发酵时间为 7、8 d 时的 CP 含量分别为 43.28%和 43.21%，显著高于其他时间组(P<0.05)，。综合考虑 TTN 和 CP 含量以及发酵成本，最终确定 8 d 为最佳发酵时间。

表 6 发酵时间对茶渣营养价值的影响（干物质基础）

Table 6 Effects of fermentation time on nutritional value of tea residue (DM basis) %

项目 Items	发酵时间 Fermentation time/d							
	2	3	4	5	6	7	8	9

茶单宁 TTN	9.79±0.15[a]	6.04±0.17[b]	3.52±0.05[c]	3.51±0.13[c]	3.25±0.12[d]	2.60±0.10[e]	1.81±0.16[f]	1.84±0.12[f]
粗蛋白质 CP	34.62±0.15[g]	36.55±0.15[f]	38.74±0.09[e]	39.18±0.10[d]	41.33±0.12[c]	43.28±0.17[a]	43.21±0.25[a]	42.35±0.16[b]

2.2 正交优化发酵条件试验结果

由极差分析（表 7）可知，各因素 TTN 降解产生影响的顺序为 C＞D＞B＞A，即影响茶渣发酵降解 TTN 的因素依次为发酵温度、发酵时间、接种量、料水比。由 TTN 含量的 K 值可得最佳组合为 $A_3B_2C_3D_2$，即料水比 1.0∶1.5、接种量 1.00×10^6 个/g、发酵温度 37 ℃、发酵时间 8 d。由极差分析（表 7）可知，各因素对 CP 含量产生影响的顺序为 C＞A＞D＞B，即影响茶渣发酵提高 CP 含量的因素依次为发酵温度、料水比、发酵时间、接种量。由 CP 含量的 K 值可知，提高 CP 含量的最佳组合为 $A_2B_3C_3D_2$，即料水比 1.0∶1.4、接种量 1.25×10^6 个/g、发酵温度 37 ℃、发酵时间 8 d。

结合单因素试验结果得出，茶渣发酵的最佳组合为 $A_2B_2C_3D_2$，即料水比 1.0∶1.4、接种量 1.00×10^6 个/g、发酵温度 37 ℃、发酵时间 8 d。

表 7 正交试验结果的极差分析表（干物质基础）

Table 7 Range analysis table of orthogonal experiment result (DM basis) %

试验号 Experiment number	因素 Factors A	B	C	D	茶单宁 TTN	粗蛋白质 CP
1	1	1	1	1	3.15	40.09
2	1	2	2	2	2.58	43.20
3	1	3	3	3	2.84	43.43
4	2	1	2	3	2.98	43.65
5	2	2	3	1	2.57	43.36
6	2	3	1	2	2.90	42.18
7	3	1	3	2	2.44	43.37

8	3	2	1	3	2.88	41.63
9	3	3	2	1	2.81	43.23
茶单宁 TTN						
K_1	2.857	2.857	2.977	2.843		
K_2	2.817	2.677	2.790	2.640		
K_3	2.710	2.850	2.617	2.900		
R	0.147	0.180	0.360	0.260		
最佳组合 **Optimum combination**	$A_3B_2C_3D_2$					
粗蛋白质 CP						
K_1	42.240	42.370	41.300	42.227		
K_2	43.063	42.730	43.360	42.917		
K_3	42.743	42.947	43.387	42.903		
R	0.823	0.577	2.087	0.690		
最佳组合 Optimum combination	$A_2B_3C_3D_2$					

K_1、K_2、K_3 分别代表结果在水平 1、2、3 下的平均值。R 代表 K_1、K_2、K_3 在各因素下的极差。

K_1, K_2 and K_3 stand for the mean value of the results under levels 1, 2 and 3, respectively. R stands for the range of K_1, K_2 and K_3 under each factor.

2.3 正交试验发酵产物营养价值分析

采用最佳发酵工艺参数，获得最佳发酵产物，茶渣发酵前后营养价值和 AA 含量变化分别见表 8 和表 9。

由表 8 可知，AN 发酵可有效提高茶渣的营养价值。与对照组相比，经 AN 发酵后茶渣

的 CP 含量由 31.22%提高到 44.56%（*P*<0.05），TP 含量由 23.64%提高到 36.99%（*P*<0.05），TTN 含量由 11.63%降低到 2.42%（*P*<0.05），NDF 含量由 39.85%降低到 32.96%（*P*<0.05），ADF 含量由 15.70%降低到 12.28%（*P*<0.05），EE 含量由 4.06%提高到 5.13%（*P*<0.05），Ash 含量由 4.09%提高到 6.09%（*P*<0.05），Ca 含量由 0.75%提高到 1.10%（*P*<0.05），P 含量由 0.32%提高到 0.47%（*P*<0.05）。

由表 9 可知，与对照组相比，经 AN 发酵后茶渣中 17 种 AA 的含量均显著提高(*P*<0.05)，且总 AA 含量由 18.45%提高到 23.38%，提高率为 26.72%。必需 AA 中的缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸和赖氨酸的提高率分别为 42.01%、25.27%、22.50%、26.20%、30.00%、31.20%和 24.62%，其中缬氨酸提高率位居 17 种 AA 提高率的榜首。

表 8　茶渣发酵前后营养价值变化（干物质基础）

Table 8　Change of nutritional value of tea residue before and after fermentation　(DM basis)　%

项目 Items	对照组 Control group	发酵组 Fermentation group	提高率 Improve rate
粗蛋白质 CP	31.22±0.19^{b}	44.56±0.08^{a}	42.73
真蛋白质 TP	23.64±0.10^{b}	36.99±0.06^{a}	56.47
茶单宁 TTN	11.63±0.19^{a}	2.42±0.07^{b}	-79.19
中性洗涤纤维 NDF	39.85±0.16^{a}	32.96±0.79^{b}	-17.29
酸性洗涤纤维 ADF	15.70±0.26^{a}	12.28±0.35^{b}	-21.78
粗脂肪 EE	4.06±0.05^{b}	5.13±0.01^{a}	26.35
粗灰分 Ash	4.09±0.06^{b}	6.09±0.08^{a}	48.90
钙 Ca	0.75±0.01^{b}	1.10±0.01^{a}	46.67
磷 P	0.32±0.00^{b}	0.47±0.01^{a}	46.88

表 9　茶渣发酵前后 AA 含量变化（干物质基础）

Table 9 Change of AA content of tea residue before and after fermentation (DM basis)

%

项目 Items		对照组 Control group	发酵组 Fermentation group	提高率 Improve rate
必需氨基酸 Essential AA	缬氨酸 Val	1.26±0.03[b]	1.79±0.03[a]	42.01
	异亮氨酸 Ile	1.01±0.02[b]	1.27±0.03[a]	25.27
	亮氨酸 Leu	1.77±0.03[b]	2.16±0.04[a]	22.50
	苯丙氨酸 Phe	1.05±0.03[b]	1.32±0.03[a]	26.20
	甲硫氨酸 Met	0.39±0.01[b]	0.50±0.02[a]	30.00
	苏氨酸 Thr	0.95±0.02[b]	1.25±0.02[a]	31.20
	赖氨酸 Lys	1.16±0.04[b]	1.44±0.04[a]	24.62
非必需氨基酸 Non-essential AA	天冬氨酸 Asp	1.89±0.03[b]	2.36±0.05[a]	25.01
	丝氨酸 Ser	0.99±0.02[b]	1.27±0.02[a]	28.09
	谷氨酸 Glu	2.39±0.06[b]	3.03±0.06[a]	26.91
	甘氨酸 Gly	1.03±0.01[b]	1.29±0.01[a]	24.90
	丙氨酸 Ala	1.12±0.02[b]	1.45±0.02[a]	28.89
	半胱氨酸 Cys	0.18±0.01[b]	0.22±0.01[a]	27.61
	酪氨酸 Tyr	0.69±0.05[b]	0.90±0.03[a]	30.29
	组氨酸 His	0.49±0.01[b]	0.60±0.02[a]	21.46
	精氨酸 Arg	1.15±0.03[b]	1.41±0.03[a]	22.01
	脯氨酸 Pro	0.93±0.04[b]	1.12±0.03[a]	20.25
总氨基酸 Total AA		18.45±0.38[b]	23.38±0.47[a]	26.72

3 讨 论

研究表明，菌种、培养基组成、料水比和原料粒度、发酵温度、菌液接种量和发酵时间等因素会影响发酵进程[20]。对于固态发酵而言，水分和原料粒度影响着好氧发酵的气体交换过程。适宜的水分和原料粒度能够保证发酵基质深层微生物对氧气的需求，疏松多孔的基质状态还能使得微生物的代谢废物及时排出，基质内部的养分也可随着自由水通过原料间隙扩散到基质表面，满足基质表面微生物对营养的需求，有利于微生物正常繁殖并保持高产酶活性状态[21]。此外，水能够溶解发酵产生的氨态氮和蛋白质分解物，并能与蛋白质的正电荷或者负电荷相互作用，增强蛋白质的稳定性[22]，从减少氮损失，提高 CP 含量。本试验发现 1.0∶1.4 的料水比可使 TTN 含量降为最低，间接表明在此料水比下单宁酶产量最高。Yee 等[23]研究原料粒度和含水量对 AN 发酵树皮生产单宁酶的影响，结果发现 1.0∶1.5 的初始料水比可获得最佳单宁酶产量，此结果与本试验所得最佳料水比相似。Mahdi 等[24]发现 AN Ass19 发酵麸皮时最大单宁酶产量对应的料水比为 1∶3，高于本试验结果，可能的原因是 AN 类型和发酵底物以及底物初始含水率与本试验不同。

温度极易影响菌体中核酸与蛋白质等重要成分的生理功能，过低的温度会抑制微生物体内酶的活性，降低繁殖效率，过高的温度则会损伤菌体内蛋白质的高级结构，可能直接杀死微生物[25]。另外，AN 等真菌的适宜生长温度较为宽泛，一般在 20～55 ℃的温度范围内都可以生存，但不同温度下真菌的产酶能力和产酶种类会有所不同，因此需要根据试验目的选择合适的发酵温度[26]。本试验的目的是利用 AN 产单宁酶，进而降解茶渣中的 TTN，研究发现 36 ℃时 TTN 含量降为最低且 CP 含量最高，表明此温度下单宁酶产量最佳且 AN 生长菌丝最多。汤小朋[26]发现 AN 发酵木薯渣时羧甲基纤维素酶活性和 CP 含量在 36 ℃时为最高，与本试验结果一致，说明羧甲基纤维素酶在 36 ℃时具有最大产量，这可能也是本试验中茶渣发酵后 ADF 和 NDF 含量降低的原因。Aboubakr 等[27]将 AN 的发酵温度从 30 ℃提高到 35 ℃，发现单宁酶活性从 6.100 U/mL 提升到 6.254 U/mL，说明 35 ℃更有利于 AN 产单宁酶，与本试验所得最佳发酵温度接近。

微生物的接种量和发酵时间会影响发酵工业的经济效益。较低的接种量不仅会减缓发酵进程，增加杂菌污染的概率，还会延长发酵时间，增加发酵成本；过高的接种量虽然能够降低杂菌污染的可能性，但微生物在短时间内会大量扩增繁殖，在造成底物中代谢副产物过量积聚，反馈抑制微生物的生长速度与产酶能力的同时还会引起培养基消耗过快且黏度增加，不利于氧的扩散，反而加速细胞凋亡，影响产物的合成和降低发酵效率[25]。因此，必须选择合适的接种量，以使微生物既能抵抗杂菌污染，正常繁殖、产酶，还能缩短发酵时间，从而提高发酵效益。本试验发现 AN 发酵茶渣的最优接种量为 1.00×10^6 个/g，与赵华等[28]研究得出的 AN 发酵甘薯渣的最佳接种量一致，但其发酵时间要短于本试验所得最佳发酵时间，可能是由于甘薯渣的营养价值要远低于茶渣，微生物的生长提前结束。Wang 等[29]利用 AN 发酵茶梗获取单宁酶，其最佳接种量为 4×10^7 个/g，菌种类型、发酵温度以及底物组成不同可能是导致其所得最佳接种量是本试验所得最佳接种量 40 倍的原因。

本试验中，茶渣经过 AN 发酵后，NDF 和 ADF 含量分别降低了 17.29%和 21.78%，与张玉诚等[30]研究白酒糟发酵和唐庆凤等[31]研究木薯渣发酵的结果相似；Ash、Ca 和 P 含量分别提高了 48.90%、46.67%和 46.88%，与汤小朋[26]和张玉诚等[30]的研究结果相似；EE 含量提高了 26.35%，与汤小朋[26]和赵华等[32]的研究结果变化趋势一致；TP 含量提高了 56.47%，与张玉诚等[30]的研究结果相似。AN 在利用茶渣和玉米粉中的碳源、氮源及其他营养因子进行自身生长与代谢的过程中，也能产生纤维素酶和淀粉酶等酶类，将纤维素、淀粉等碳水化合物分解为二氧化碳和水，二氧化碳和部分水分逸散，其余水分和氮源将被微生物利用合成菌体蛋白，这样就使得原料中的 NDF、ADF 和 DM 含量降低，CP、TP、EE、Ash、Ca 和 P 含量相应升高，但茶渣和玉米粉的营养价值绝对含量保持不变或者略有降低。本试验中 17 种 AA 在茶渣和发酵茶渣中均有分布，但茶渣经 AN 发酵后，17 种 AA 含量均显著提高，且必需 AA 中的缬氨酸提高率最高，说明经微生物发酵后，发酵产物的 AA 含量会有所增加，这与欧荣娣[25]和张玉诚等[30]的结果相似。茶渣经 AN 发酵后 EE 含量提高的另一个可能原因

是 AN 将碳水化合物转化为脂肪[26]。总体而言，AN 在发酵茶渣的过程中会降解 TTN，同时积累大量菌体蛋白和代谢产物，从而提高茶渣的营养价值。

4 结 论

① 以 AN 发酵茶渣，最佳工艺为玉米粉含量 5%、料水比 1∶1.4、接种量 1.00×10^6 个/g、发酵温度 37 ℃、发酵时间 8 d、自然 pH。

② 在最佳发酵工艺下经 AN 发酵后，茶渣的 CP、TP、EE、Ash、Ca、P 和 17 种 AA 含量显著提高，TTN、NDF 和 ADF 含量显著下降。

参考文献：

[1] 郑青梅,陈坤平,钟艳梅,等.4 类茶叶及其茶渣主要成分的测定与分析[J].广东农业科学,2015,42(6):14–20.

[2] 龚郁,占今舜,邬理洋,等.茶多酚的生物学功能及其在禽生产中的应用[J].中国饲料,2012(14):31–34.

[3] KIM E Y,PAI T K,HAN O.Effect of bioactive dietary polyphenols on Zinc transport across the intestinal Caco-2 cell monolayers[J].Journal of Agricultural and Food Chemistry,2011,59(8):3606–3612.

[4] BHAT T K,KANNAN A,SINGH B,et al.Value addition of feed and fodder by alleviating the antinutritional effects of tannins[J].Agricultural Research,2013,2(3):189–206.

[5] YANG X P,KONG F B.Effects of tea polyphenols and different teas on pancreatic α-amylase activity *in vitro*[J].LWT-Food Science and Technology,2016,66:232–238.

[6] 翟耀明,董晓芳,佟建明.我国食品及制造业糟渣类饲料资源的应用[J].动物营养学报,2014,26(7):1728–1737.

[7] 陈仕学,王一帆,姚元勇,等.响应面法优化茶渣水不溶性膳食纤维的提取及性能研究[J].食品工业科技,2015,36(10):249–253,258.

[8] 苗人云,谭伟,周洁,等.茶渣作为主料栽培姬菇的研究[J].西南农业学报,2016,29(1):164–168.

[9] 刘顺航,贾黎辉,吴春燕,等.茶渣有机肥发酵工艺研究[J].安徽农业科学,2016,44(11):165–167.

[10] CHERAGHI M,LORESTANI B,MERRIKHPOUR H,et al.Assessment efficiency of tea waste in arsenic removal from aqueous solution[J].Desalination and Waste Treatment,2014,52(37/38/39):7235–7240.

[11] FOROUGHI-DAHR M,ABOLGHASEMI H,ESMAILI M,et al.Adsorption characteristics of Congo red from aqueous solution onto tea waste[J].Chemical Engineering Communications,2015,202(2):181–193.

[12] TAKAGAKI A,FUKAI K,NANJO F,et al.Application of green tea catechins as formaldehyde scavengers[J].Journal of the Japan Wood Research Society,2000,46(3):231–237.

[13] SHI C Y,HE J,YU J,et al.Physicochemical properties analysis and secretome of *Aspergillus niger* in fermented rapeseed meal[J].PLoS One,2016,11(4):e0153230.

[14] VISWANATH V,LEO V V,PRABHA S S,et al.Biosynthesis of tannase from cashew testa using *Aspergillus niger* MTCC5889 by solid state fermentation[J].Journal of Food Science and Technology,2015,52(11):7433–7440.

[15] NI H,CHEN F,JIANG Z D,et al.Biotransformation of tea catechins using *Aspergillus niger* tannase prepared by solid state fermentation on tea byproduct[J].LWT-Food Science and Technology,2015,60(2):1206–1213.

[16] 张丽英.饲料分析及饲料质量检测技术[M].3 版.北京:中国农业大学出版社,2007:52–64,78–80,140–147.

[17] VAN SOEST P J,ROBERTSON J B,LEWIS B A.Methods for dietary fiber,neutral detergent fiber,and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition[J].Journal of Dairy Science,1991,74(10):3583–3597.

[18] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.GB/T 8313–2002 茶 茶多酚测定[S].北京:中国标准出版社,2002.

[19] 胡艳丽,王克然.饲料中真蛋白的测定[J].河南畜牧兽医（综合版）,2007,28(10):31–32.

[20] RUQAYYAH T I D,JAMAL P,ALAM M Z,et al.Application of response surface methodology for protein enrichment of cassava peel as animal feed by the white-rot fungus *Panus tigrinus* M609RQY[J].Food Hydrocolloids,2014,42:298–303.

[21] BHATTACHARYA S S,GARLAPATI V K BANERJEE R.Optimization of laccase production using response surface methodology coupled with differential evolution[J].New Biotechnology,2011,28(1):31–39.

[22] 魏金涛,齐德生,张妮娅,等.饲料水分活度及其应用[J].中国饲料,2007(1):35-37.

[23] YEE T W,PRABHU N G,JAIN K,et al.Process parameters influencing tannase production by *Aspergillus niger* using mangrove (*Rhizophora apiculata*) bark in solid substrate fermentation[J].African Journal of Biotechnology,2011,10(61):13147–13154.

[24] MAHDI Z S,AL-TAHAN S S.Production of Tannase from *Aspergillus niger* under solid state fermentation[J].Iraqi Journal of Science,2014,55(3B):1188–1195.

[25] 欧荣娣.红薯渣发酵生产菌体蛋白饲料研究[D].硕士学位论文.长沙：湖南农业大学,2015.

[26] 汤小朋.单菌及混菌固态发酵改善木薯渣品质的研究[D].硕士学位论文.雅安：四川农业大学,2014.

[27] ABOUBAKR H A,EL-SAHN M A,EL-BANNA A A,et al.Some factors affecting tannase

production by *Aspergillus niger* Van Tieghem[J].Brazilian Journal of Microbiology,2013,44(2):559–567.

[28] 赵华,王雪涛,汤加勇,等.黑曲霉固态发酵甘薯渣条件优化及发酵对甘薯渣营养品质的影响[J].四川农业大学学报,2015,33(1):51–56.

[29] WANG F,NI H,CAI H N,et al.Tea stalks-a novel agro-residue for the production of tannase under solid state fermentation by *Aspergillus niger* JMU-TS528[J].Annals of Microbiology,2013,63(3):897–904.

[30] 张玉诚.白酒糟菌体蛋白饲料开发研究[D].硕士学位论文.雅安：四川农业大学,2014.

[31] 唐庆凤,彭开屏,韦升菊,等.不同微生物添加剂组合固态发酵对木薯渣品质的影响[J].动物营养学报,2016,28(6):1965–1974.

[32] 赵华,王雪涛,汤加勇,等.复合益生菌固态发酵改善甘薯渣营养价值的研究[J].动物营养学报,2015,27(4):1191–1198.

Nutritional Improvement of Tea Residue by Solid-State Fermentation with *Aspergillus niger*

ZHU Fei[1] SU Di[1] RAN Lei[1] FAN Caiyun[1] ZHANG Zijun[1] LIU Zhengquan[2] WAN Xiaochun[2*] CHENG Jianbo[1*]

(1. *College of Animal Science and Technology*, *Anhui Agricultural University*, *Hefei* 230036, *China*; 2. *State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization*, *Anhui Agricultural University*, *Hefei* 230036, *China*)

Abstract: In this study, a solid-state fermentation using *Aspergillus niger* (AN) was conducted to improve the nutritional quality of tea residue and the optimal fermentation parameters were investigated. Considering the tea tannin (TTN) and crude protein (CP) contents as indexes, a single factor experiment design and a $L_9(3^4)$ orthogonal experiment design were adopted to optimize the corn flour content, substrate/moisture, inoculation, fermentation temperature and fermentation time. The results showed as follows: 1) added 5% corn flour, inoculated 1.00×10^6

*Corresponding authors: WAN Xiaochun, professor, E-mail: xcwan@ahau.edu.en; CHENG Jianbo, professor, E-mail: chengjianboahau@163.com （责任编辑　菅景颖）

Aspergillus niger spore per gram fermentation materials, controlled substrate/moisture 1.0：1.4 at 37 ℃ for 8 days could get the optimal result. 2) Under the optimal fermentation process conditions, calculated based on dry matter (DM) and compared with the control group, the CP content was increased from 31.22% to 44.56% (P<0.05), the true protein (TP) content was increased from 23.64% to 36.99% (P<0.05), the ether extract (EE) content was increased from 4.06% to 5.13% (P<0.05), the crude ash (Ash) content was increased from 4.09% to 6.09% (P<0.05), the calcium (Ca) content was increased from 0.75% to 1.10% (P<0.05) and the phosphorus (P) content was increased from 0.32% to 0.47%(P<0.05), the improvement rate of them were 42.73%, 56.47%, 26.35%, 48.90%, 46.67% and 46.88%, respectively; the TTN content was decreased from 11.63% to 2.42% (P<0.05), the neutral detergent fiber (NDF) content was decreased from 39.85% to 32.96% (P<0.05) and the acid detergent fiber (ADF) content was decreased from 15.70% to 12.28% (P<0.05), the degradation rate of them were 79.19%, 17.29% and 21.78%, respectively; the contents of 17 kinds of amino acids (AA) increased significantly (P<0.05) and the total AA content increased by 26.72%. The results indicate that the solid-state fermentation with *Aspergillus niger* can improve the nutritional value of tea residue significantly.

Key words: *Aspergillus niger*; tea residue; tea tannin; solid-state fermentation; nutritional value